

*Bacillus subtilis*로부터 항진균 리포펩타이드 물질 Iturin의 생산

손 광 현 · *이 항 우 · *김 성 옥 · *복 성 해 · 김 정 회

한국과학기술원 생물공학과

*한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물소재그룹

Production of Antifungal Lipopeptide Iturin by *Bacillus subtilis*

Kwang-Hyun Son, *Hang-Woo Lee, *Sung-Uk Kim,
*Sung-Hae Bok and Jung-Hoe Kim

Department of Biotechnology, Korea Advanced Institute of Science and
Technology, Taejeon 305-701, Korea

*KIST, Genetic Engineering Research Institute, Bioproducts Research Group
P. O. Box 17, Daeduk Science Town, Taejeon 305-606, Korea

ABSTRACT

Iturin, an antifungal lipopeptide, fermentation by *Bacillus subtilis* was investigated focusing on the effects of nutrients, aeration and specific cell growth rate on iturin production. Cell growth and product formation were not affected by different kinds of carbon sources such as sucrose, glucose and fructose. Soytone concentration above 20g/l did not influence iturin production. Diauxic growth pattern appeared when only soytone was used as a sole nitrogen source probably due to the shortage of amino acids and/or peptides in soytone which could be favorably assimilated by the cells. The composition of three major components in iturin was not changed significantly by the variation of dissolved oxygen concentration of the culture broth, but changed substantially by the change of specific growth rate of the cells.

서 론

Iturin은 *Bacillus subtilis*가 분비하는 cyclic lipopeptide로서, 항진균력이 뛰어난 것으로 알려져 있다(1-3). 이 화합물은 7개의 L-형 및 D-형 아미노산에 소수성인 β -아미노산이 환상의 구조로 연결되어 있다. 또한 이 β -아미노산은 지방산의 탄소수와 이성질체에 따라서 n-C₁₄- β -아미노산, anteiso-C₁₅- β -아미노산, iso-C₁₅- β -아미노산, n-C₁₆- β -아미노산, iso-C₁₆- β -아미노산으로 나누어진다(3-5). 지방산의 탄소수가 많을수록, 그리고 n-아미노산보다는 iso-

나 anteiso-아미노산을 함유한 것이 항진균력이 더 뛰어난 것으로 보고되었다(6). 본 연구는 토양에서 분리한 *Bacillus subtilis* B326 균주를 이용하여 배지 성분 및 배양조건이 iturin의 생산에 미치는 영향뿐만 아니라 각 구성성분의 분포에 미치는 영향을 알아 보고자 수행되었다.

재료 및 방법

사용균주 및 보존

균주는 복 등(7)이 토양에서 분리 동정한 *Bacil-*

lus subtilis B326 균주를 사용하였다. 생산균을 LB 배지(tryptone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%, glucose 1.0%)에서 배양한 후 최종 농도 10%의 glycerol과 섞어, 1.0ml씩 vial에 분주한 후 -20℃에 냉동보관하며 사용하였다.

중균배양 및 배지

냉동보관된 균주를 LB plate에 도달한 후 생긴 단일 colony를 LB 배지를 함유한 시험관에서 9~12시간 동안 30℃, 200rpm에서 진탕 배양하였다. 그 후, 50ml의 LB 배지를 함유한 250ml의 삼각플라스크에 옮긴 후 위와 같은 조건에서 4~6시간 동안 배양한 것을 접종액으로 사용하였다. 발효용 배지의 기본조성은 sucrose 30g/l, soytone 10g/l, yeast extract 5g/l, K₂HPO₄ 0.5g/l, MgSO₄ 0.5g/l, MnCl₂ 4mg/l, CaCl₂ 5mg/l, FeSO₄·7H₂O 25mg/l을 사용하였다(8).

배양

플라스크 배양은 50ml의 배지를 함유한 250ml 삼각플라스크를 진탕배양기에서 30℃, 200rpm으로 배양하면서 정기적으로 시료를 채취하였다. 연속배양은 5 l의 jar fermentor(working volume 3 l, Korea Fermentor CO.)에서 30℃, pH 7.0, 400rpm, 0.2vvm으로 실험하였으며 용존 산소농도의 효과를 알아보기 위한 실험에서는 배양액의 부피를 일정하게 유지하기 위해 순수한 산소가스를 공기와 섞어서 공급하였다. 또한, silicone계의 소포제를 사용하여 거품발생을 억제하였다.

균체량 측정

균체의 optical density는 Milton Roy Spectronic 21을 사용하여 550nm에서 측정하였다. 건조균체량은 10ml의 배양액을 3000~5000rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전균체를 0.9% 식염수 10ml로 세척하였다. 다시 원심분리하여 생긴 침전균체를 증류수에 현탁시킨 다음 이미 무게를 측정된 aluminum foil dish에서 105℃, 10시간 동안 건조시킨 후 건조균체량을 측정하였다.

Iturin의 정량

HPLC를 이용한 정량방법은 Phae 등(9)의 방법을 이용하였으며 분석조건은 다음과 같다.: Column; Shim-Park CLC-ODS (M) 250mm, 이동상; acetonitrile-ammonium acetate(10mM) 2: 3(v/v), 유속; 1ml/min, 파장; 280nm.

결과 및 고찰

세포성장과 Iturin 생산에 대한 탄소원의 효과

50ml 배지를 함유한 삼각 플라스크에서 진탕배양한 결과 최종 세포농도는 6.5g/l였으며, Iturin의 생산량은 0.9g/l로 나타났다(Fig. 1). 또한 세포성장이 10시간 경과 후에 감소하였다가 다시 증가하는 diauxic growth 현상이 나타났다. 이 현상의 원인을 밝혀내기 위해 먼저 탄소원의 효과를 살펴 보았다. 이는 세포가 탄소원인 sucrose를 이용시 glucose와 fructose로 분해되는 두 종류의 당에 대한 이용순서

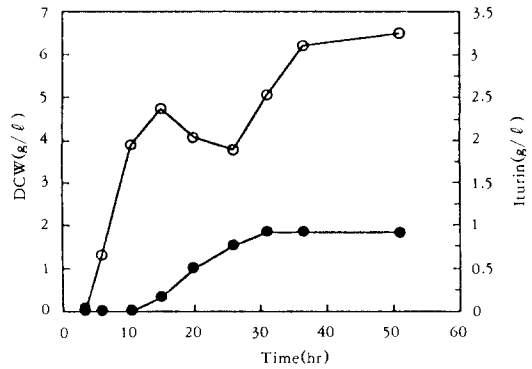


Fig 1. Cell growth and Iturin production in flask culture. Cell growth(○), Iturin production (●).

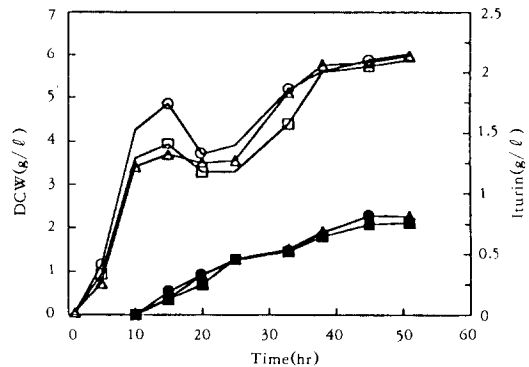


Fig 2. Effect of carbon source on cell growth and Iturin production. Sucrose(○), Glucose (□) and Fructose(△) for cell growth: Sucrose(●), Glucose(■) and Fructose(▲) for Iturin production.

의 차이에 의한 것인가를 알아보기 위한 실험이었다. 그러나 Fig. 2에서 보여주듯이 glucose, fructose 그리고 sucrose 세 종류의 탄소원 모두 유사한 세포성장 양상을 보여주고 있다. 이 결과는 diauxic growth가 탄소원에 의한 것이 아님을 보여준다. 생성된 iturin의 농도에서도 glucose를 사용한 경우가 약간 낮았으나(0.76g/l) 나머지 두 경우는(0.81g/l) 큰 차이가 없었다.

세포성장과 Iturin 생산에 대한 Soytone의 효과

배지성분 중 질소원인 soytone의 농도를 변화시켜 비교하였다(Fig. 3). Soytone의 농도가 10g/l 인 경우 15시간이 경과한 후에 세포농도가 감소하기 시작하나 20g/l 와 30g/l 의 경우 20시간이 경과한 후에야 감소하기 시작했다. 그리고 세포농도가 다시 증가하기 시작하는 시간도 10g/l 의 경우가 나머지 경우보다 더 빨리 나타났다. 최종 세포농도는 soytone의 농도가 증가할수록 증가하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 soytone 내에 쉽게 이용할 수 있는 질소원과 그렇지 않은 질소원이 동시에 존재하며 이것이 diauxic growth의 원인일 것이라고 생각하였다. 생성된 Iturin의 농도는 soytone의 농도가 10g/l, 20g/l, 30g/l 일 경우 각각 0.84g/l, 1.13g/l, 1.20g/l 로 20g/l 와 30g/l 에서는 큰 차이가 없었다.

세포성장과 Iturin 생산에 대한 아미노산 혼합물의 효과

Soytone이 아미노산의 monomer 또는 oligomer로 구성된 것에 근거하여 아미노산만의 혼합물을 사용하여 실험을 수행하였다. 아미노산의 혼합물로서는 시판되고 있는 중외제약의 8.5% Freeamine용액을 사용하였다. 그리고 soytone 내의 아미노산 함량이 약 50%인 점을 고려하여 배지 내 질소원의 함량을 일정하게 맞추기 위하여 아미노산 혼합물만을 이용할 때는 10g/l 를 사용하였으며 soytone과 아미노산 혼합물을 함께 사용할 때도 총 아미노산의 양을 10g/l 수준으로 하였다. Fig. 4에서 보여주듯이 아미노산의 혼합물과 soytone을 섞어 사용한 경우에는 soytone 만을 사용한 경우보다 5시간 정도 더 늦게 세포농도가 감소하기 시작하였다. 그리고 아미노산 혼합물만을 질소원으로 사용하였을 경우에는 세포성장 중간에 lag time이 나타나지 않고 30시간이 경과한 후에 stationary phase에 이르렀다. 따라서 soytone과 같은 종류의 복합배지를 사용하였을 때

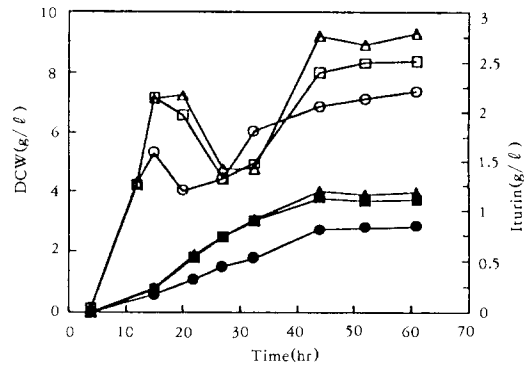


Fig. 3. Effect of soytone concentration on cell growth and Iturin Production. 10g/l (○), 20g/l (□) and 30g/l (△) for cell growth: 10g/l (●), 20g/l (■) and 30g/l (▲) for Iturin production.

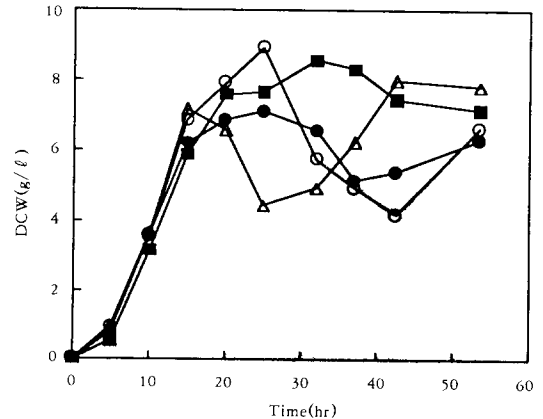


Fig. 4. Effect of free amino acids and soytone on cell growth. Soytone 20g/l (△), free amino acid 5g/l + soytone 10g/l (○), free amino acid 10g/l (■).

나타나는 diauxic growth(9)는 배지 내에 존재하는 soytone 유래의 아미노산과 펩타이드 때문이라는 것을 알 수 있었다. 이것은 첫번째 성장기간 동안에는 아미노산이 이용되고 그후 lag time동안 펩타이드를 분해하여 이용할 수 있는 질소원으로 전환시킨 다음 다시 성장을 시작하는 것으로 생각된다.

생성된 Iturin의 양은 soytone 5g/l 와 아미노산 혼합물 7.5g/l 를 섞어 사용하였을 경우에 가장 높은 값인 1.45g/l 로 soytone만을 사용하였을 때보다

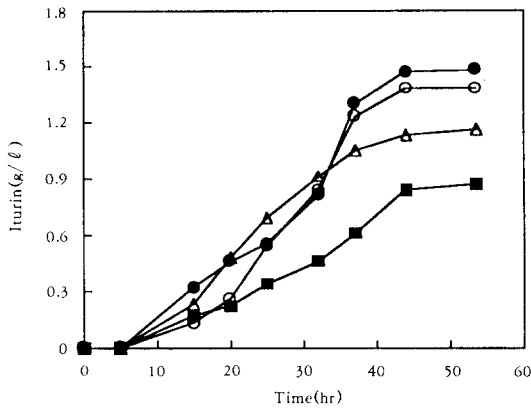


Fig 5. Effect of free amino acids and soytone on Iturin production. Soytone 20g/l (△), free amino acid 5g/l +soytone 10g/l (○), free amino acid 7.5g/l +soytone 5g/l (●), free amino acid 10g/l (■).

30% 정도 더 증가된 값이다. 아미노산 혼합물만을 사용하였을 때가 0.81g/l로 가장 낮았다(Fig. 5). 이상으로 미루어 보아 soytone 내에 Iturin 생합성을 촉진하는 어떤 물질들이 함유되어 있거나 또는 전구체가 함유되어 있음을 시사해주고 있다.

Iturin 유도체의 분포에 대한 탄소원과 질소원의 영향

Iturin은 6개의 유도체가 존재한다고 알려져 있으나 이 중에서 n-C₁₄-β-amino acid, anteiso-C₁₅-β-amino acid 그리고 iso-C₁₅-β-amino acid를 함유한 유도체가 주요 성분으로 약 80~90%를 차지하고 있다(9). 역가측면에서 aliphatic chain의 탄소수가 많을수록 그리고 anteiso형보다는 iso형이 항진균력이 강한 것으로 보고되었다. 그러므로 앞 실험에서 얻은 시료를 HPLC로 분석하여 Iturin 유도체 중 3가지 구성 성분의 분포에 미치는 탄소원과 질소원의 영향을 조사하였다(Table 1).

탄소원의 경우 glucose, fructose, sucrose 세 가지에서 모두 유도체의 분포에 차이는 나타나지 않았다. 이는 세 종류의 탄소원이 같은 분해과정을 거치기 때문에 지방산 생합성시 필요한 chain initiators의 비에서 차이가 없기 때문인 것으로 추측된다. 질소원의 경우 n-C₁₄의 비가 약 50% 증가하였으며 iso-C₁₅의 비는 약 50% 정도 감소하였다. 또한 anteiso-C₁₅이 iso-C₁₅보다 증가하였다. 아마도 soy-

Table 1. Effect of carbon and nitrogen sources on distribution of Iturin components.

Carbon and nitrogen sources(g/l)	Distribution of iturin components		
	n-C ₁₄	Anteiso-C ₁₅	Iso-C ₁₅
Sucrose(30)	38	24	28
Glucose(30)	36	20	25
Fructose(30)	37	21	23
Soytone(20)	34	18	24
Free amino acid(10)	57	17	11
Free amino acid(7.5) + Soytone(5)	42	24	19
Free amino acid(5) + Soytone(10)	46	26	10

tone과 아미노산 간에 aliphatic chain의 전구체의 조성비가 다르기 때문인 것으로 추측된다.

세포성장과 Iturin 생산 및 유도체의 분포에 대한 Aeration의 영향

Baffled flasks를 사용하여 배양한 결과 최종 세포 농도는 14g/l로 일반 삼각 flasks 경우보다 2배 가량 높았으나, iturin의 생산은 2배 정도 낮게 생산되었다(Fig. 6) 또한 β-아미노산의 지방산 분포에 있어 일반 삼각 flasks의 경우에는 n-C₁₄: anteiso-C₁₅: iso-C₁₅의 분포가 40:18:23인 반면 baffled flasks의 경우에는 65:7:6으로 branched-fatty acid를 함유한 iturin의 양이 크게 감소하였다. 이러한 결과가 용존산소 농도 때문인지 비성장속도의 차이에 의한

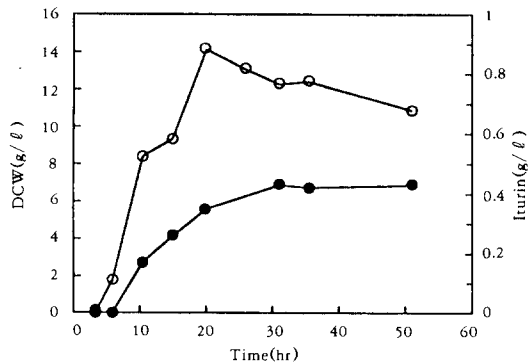


Fig 6. Cell growth and iturin production in baffled flasks culture. Cell growth(○), Iturin production(●).

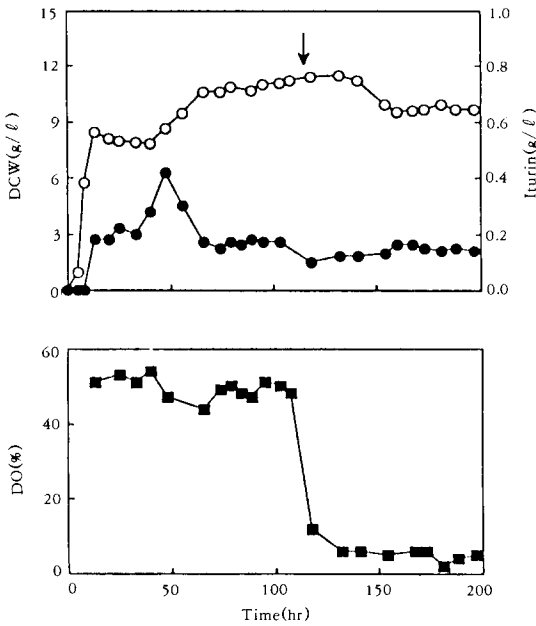


Fig 7. Effect of dissolved oxygen(DO) concentration on cell growth and iturin production in continuous culture at $D=0.1\text{hr}^{-1}$. Cell growth(\circ), Iturin production(\bullet): Arrow indicates the time when enriched air with oxygen is replaced with air.

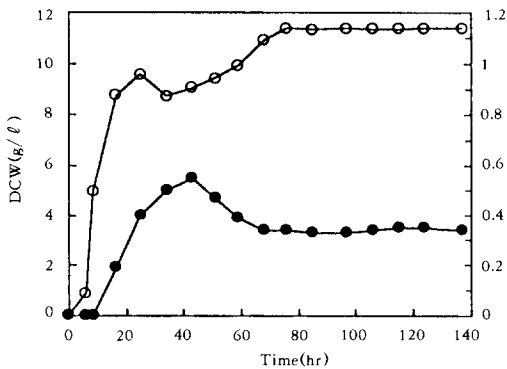


Fig 8. Fermentation profile at $D=0.05\text{hr}^{-1}$. Cell growth(\circ), Iturin production(\bullet).

것인지를 알아 보기 위해 연속배양을 수행하였다.

먼저 비성장속도를 $0.1/\text{hr}$ 로 유지하면서 용존산소를 50% 포화상태로 배양한 결과 정상상태에서 세포

농도는 $11.04\text{g}/\ell$ 이었고 iturin의 농도는 $0.18\text{g}/\ell$ 이었다. 그리고 iturin 구성성분의 분포에 있어서는 anteiso- C_{15} - β -amino acid가 거의 생성되지 않았으며 n- C_{14} 와 iso- C_{15} - β -amino acid가 각각 89%와 11%로 나타났다. 그후 용존산소를 5% 포화상태로 유지했을 때 세포농도는 $9.63\text{g}/\ell$, iturin의 양은 $0.16\text{g}/\ell$ 이었다(Fig. 7). 그리고 iturin 구성성분의 분포에 있어서도 차이가 나타나지 않았다.

비성장속도를 $0.05/\text{hr}$ 로 유지하면서 배양하였을 때 세포농도는 $11.2\text{g}/\ell$ 이었고 iturin의 양은 $0.35\text{g}/\ell$ 이었다(Fig. 8). 그리고 iturin 구성성분의 분포는 55%, 11%, 18%로 나타났다. 이러한 결과로부터 비성장속도가 낮아짐에 따라 branched-fatty acid를 함유한 iturin의 양이 증가한다는 것을 알 수 있다.

요 약

*Bacillus subtilis*에 의한 항진균 물질인 Iturin의 생산에 관한 연구를 수행하였다. 세포성장과 iturin의 생산은 탄소원인 sucrose, glucose 그리고 fructose에 의해서는 영향을 받지 않았으며, soytone의 농도가 $20\text{g}/\ell$ 일 때가 $10\text{g}/\ell$ 인 경우에 비해 50% 정도 산물생산이 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 영향이 없었다. 질소원으로 soytone만을 사용하였을 때 나타나는 diauxic growth는 아미노산과 펩타이드에 대한 세포의 기질 이용의 차이 때문이었다. Iturin의 구성성분의 분포는 배양액의 용존산소 농도에 의해서는 영향을 받지 않았으며, 세포의 비성장속도에 의해 영향을 받았다.

참고문헌

1. F. Besson, F. Peypoux, G. Michel and L. Delcambe(1976), *J. Antibiotics*, **29**, 1043.
2. F. Besson, F. Peypoux, G. Michel and L. Delcambe(1978), *J. Antibiotics*, **31**, 284.
3. G. Winkelmann, H. Allagaier, R. Lupp and G. Jung(1983), *J. Antibiotics*, **36**, 1451.
4. F. Peypoux, M. Guinand, G. Michel and Delcambe(1978), *Biochemistry*, **17**, 3992.
5. A. Isogai, S. Takayama, S. Murakoshi and A. Suzuki(1982), *Tetrahedron Lett.*, **23**, 3065.

6. C. G. Phae and M. Shoda(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 118.
7. 김성욱, 이지우, 이상한, 복성해(1991), *산업미생물학회지*, **19**, 337.
8. 손광희, 권혜경, 이항우, 복성해(1991), *산업미생물학회지*, **19**, 614.
9. C. G. Phae and M. Shoda(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 118.